临床研究

一种罕见α-地贫基因突变HbH病(--^{SEA}/α$^{*92A>G}$α)的家系分析与基因诊断

颜善活[1],劳可干[1],符可鹏[1],龚菲菲[1],温晓君[2],周万军[2]
[1]广西壮族自治区钦州市妇幼保健院,广西 钦州 535099;[2]南方医科大学医学遗传学教研室,广东 广州 510515

摘要:目的 鉴定中国南方人群中的一种罕见α-地贫基因突变,以及此突变所致HbH病的家系分析和基因诊断。**方法** 采集家系成员外周全血,进行血液学表型分析和地贫基因常规检测,对常规检测基因型与表型不符的标本进一步DNA测序分析。**结果** 该家系中检出罕见α-地贫基因*92A>G突变,确认先证者及先证者姐姐基因型为--^{SEA}/α$^{*92A>G}$α的非缺失型HbH病,先证者哥哥基因型为-α$^{3.7}$/α$^{*92A>G}$α的标准型α-地贫、父亲基因型为αα/α$^{*92A>G}$α的静止型α-地贫。**结论** 首次鉴定报道了中国南方人群中罕见α-地贫基因*92A>G突变,以及携带此突变的静止型α-地贫、复合此突变非缺失型HbH病的基本表型特征,丰富了中国人群α-地贫基因突变谱,有助于指导α-地贫的人群筛查、临床基因诊断和遗传咨询。

关键词:地中海贫血;HbH病;突变;家系;基因诊断

Hemoglobin H disease with a rare α-thalassemia gene mutation (--^{SEA}/α$^{*92A>G}$α): pedigree analysis and genetic diagnosis

YAN Shanhuo[1], LAO Kegan[1], FU Kepeng[1], GONG Feifei[1], WEN Xiaojun[2], ZHOU Wanjun[2]
[1]Qingzhou Maternal and Child Healthcare Hospital, Qingzhou 535099, China; [2]Department of Medical Genetics, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To identify a rare α-thalassemia gene mutation in a family from south China and perform a pedigree analysis and genetic diagnosis of hemoglobin H (HbH) disease caused by this mutation. **Methods** Peripheral blood samples were collected from the family members for analysis of the hematological phenotype and routine test of thalassemia genes. DNA sequencing was carried out for samples that showed genotype and phenotype inconsistency. **Results** A rare α-thalassemia *92A>G gene mutation was detected within this family. The proband and his sister were confirmed to have non-deletional HbH disease with a --^{SEA}/α$^{*92A>G}$α genotype. The proband's brother was confirmed to have an α-thalassemia trait with the genotype of -α$^{3.7}$/α$^{*92A>G}$α. The proband's father was identified as an α-thalassemia silent carrier with the genotype of αα/α$^{*92A>G}$α. **Conclusion** A rare α-thalassemia *92A>G gene mutation was identified for first time in south China. The description of the basic phenotypic characteristics of α-thalassemia trait and silent carrier caused by this mutation enriches the α-thalassemia gene mutation spectrum in Chinese population and helps in population screening, clinical molecular diagnosis and genetic counseling.

Key words: thalassemia; hemoglobin H disease; mutation; pedigree; genetic diagnosis

α-地中海贫血(简称"地贫")是我国南方地区高发遗传病,其中广西和广东的人群携带率分别高达17.6%和8.5%[1-2],重型或中间型为严重致死致残性疾病,通过分子筛查和遗传咨询,对高风险胎儿进行产前基因诊断而防止重型患儿的出生,是当前国际上公认的首选措施。α-地贫是源于α珠蛋白基因缺失或点突变而导致的α珠蛋白链合成减少或缺乏,中国南方最常见的α-地贫基因主要为--^{SEA}、-α$^{3.7}$和-α$^{4.2}$缺失,以及QS、CS和WS点突变。此外仍有少数罕见或未知突变不在常规检测的范围之内,在遵循表型与基因型相结合的地贫基因诊断基本原则基础上,为避免漏检,须作进一步分析以明确突变的类型及性质。本研究即报道了一种中国人群中罕见α-地贫基因*92A>G突变复合SEA缺失血红蛋白H(HbH)病的基因诊断及家系分析。

收稿日期:2016-04-13
基金项目:广东省自然科学基金(2014A030313314)
作者简介:颜善活,副主任技师,E-mail: 386220239@qq.com
通信作者:周万军,副教授,硕士研究生导师,E-mail: zhouwanjun72@163.com

1 对象和方法

1.1 研究对象

先证者,男,出生3个月,广西钦州市人,因肺部感染来钦州市妇幼保健院儿科重症病区住院治疗,经血常

规检测发现平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白量(MCH)明显降低并有中度贫血,血红蛋白分析检出血红蛋白H(HbH)且含量较高,而常规地贫基因检测基因型为--^{SEA}/αα,疑存在其他地贫基因突变。在所有受试对象或监护人均知情同意的情况下,采集先证者及其父母、姐姐、哥哥的外周静脉全血,EDTA-K_2抗凝,进行地贫基因检测及家系分析(家系成员见图1F)。

1.2 血液学表型分析

先证者及家系成员EDTA-K_2抗凝外周静脉全血,用迈瑞BC-5380全自动五分类血液细胞分析仪(深圳迈瑞公司),按仪器操作说明书检测血红蛋白量(HGB)、MCV、MCH等红细胞参数。用Bio-Rad VARIANT™ Ⅱ血红蛋白分析系统(美国Bio-Rad公司)及配套试剂,按操作说明进行血红蛋白组份分析。

1.3 地中海贫血基因检测

先证者及家系成员EDTA-K2抗凝外周静脉全血采用经典酚-氯仿提取基因组DNA(gDNA)。用缺失型α-地中海贫血基因诊断试剂盒(gap-PCR法,深圳亚能生物公司)检测α-地贫基因--^{SEA}、-α$^{3.7}$和-α$^{4.2}$等3种常见缺失类型;用非缺失型α-地中海贫血基因诊断试剂盒(RDB法,深圳亚能生物公司)检测α-地贫基因QS、CS和WS等三种常见点突变类型;用β-地中海贫血基因诊断试剂盒(RDB法,深圳益生堂公司)检测17种常见β-珠蛋白基因点突变;用gap-PCR法检测α-地贫基因--^{THAI}缺失[3]。

1.4 α-珠蛋白基因序列测序

根据参考文献[3],以PCR法分别扩增α2及α1珠蛋白基因全长序列(α2:1085 bp,α1:1181 bp),以Sanger双脱氧链终止法,用BigDye Terminator v3.1测序试剂盒(美国ABI公司),按操作说明,于ABI 3500DX遗传分析仪(美国ABI公司),对先证者及其家系成员进行α-珠蛋白基因序列测定。测序结果于http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/进行序列比对,分析查找突变位点。

2 结果

2.1 家系成员血液学表型分析结果

该家系5个成员红细胞指标及血红蛋白分析结果见表1及图1A~E,先证者(Ⅱ$_3$)及其母亲(Ⅰ$_2$)、姐姐(Ⅱ$_2$)和哥哥(Ⅱ$_1$)均为典型MCV、MCH和HGB降低的小细胞低色素贫血表型,先证者父亲(Ⅰ$_1$)血液学表型正常;先证者(Ⅱ$_3$)、先证者母亲(Ⅰ$_2$)和先证者姐姐Ⅱ$_2$)的血红蛋白分析均显示为HbA2%降低(<2.3%),且检出异常血红蛋白H(HbH),为HbH病表型特征。

2.2 常规地中海贫血基因检测结果

如表1所列,家系成员均排除17种常见β-地贫基因点突变、3种常见α-地贫基因点突变、3种常见α-地贫基因缺失突变和--^{THAI}缺失突变。先证者母亲(Ⅰ$_2$)的表型结果显示为缺失型HbH病患者,常规地贫基因检测基因型为--^{SEA}/-α$^{3.7}$,基因型与表型相符。先证者哥哥(Ⅱ$_1$)有明显的地贫表型,而常规地贫基因检测结果为α-地贫基因-α$^{3.7}$缺失携带者,提示可能存在未检出的其它罕见或未知α-地贫基因突变。先证者(Ⅱ$_3$)及其姐姐(Ⅱ$_2$)的表型结果均显示为HbH病患者,但常规地贫基因检测结果均为α-地贫基因---^{SEA}缺失携带者,也提示存在未检出的其它罕见或未知α-地贫基因突变。

表1 先证者及家人的血液学表型和基因检测结果

Tab.1 Hematological and genetic test results of the proband and his family members

Member	Age	MCV (fl)	MCH (pg)	HGB (g/L)	HbF (%)	HbA2 (%)	HbH (%)	Genotype
Father (I$_1$)	39 y	86.1	29	134	0.1	2.8		αα/α$^{*92A>G}$α
Mother (I$_2$)	32 y	68.3	16.6	92	1.5	1.9	5.8	--^{SEA}/-α$^{3.7}$
Brother (II$_1$)	10 y	66.6	21.2	105	1.5	2.6		-α$^{3.7}$/α$^{*92A>G}$α
Sister (II$_2$)	13 y	64.6	18.4	81	0.9	1.0	9.8	--^{SEA}/α$^{*92A>G}$α
Proband (II$_3$)	3 m	53.1	15.7	74	11.3		18.3	--^{SEA}/α$^{*92A>G}$α

2.3 α-珠蛋白基因测序结果

该家系中,先证者母亲(Ⅰ$_2$)无α1珠蛋白基因目的序列扩增产物,且α2珠蛋白基因序列中未检出突变,与其表型结果相符;其它成员均检出α2珠蛋白基因3'端非编码区(3'UTR)92A>G突变(Poly A:AATAAA>AATGAA,α$^{*92A>G}$),结合2.2的检测结果,确定家系成员基因型,经分析表型与基因型结果相符(表1,图2)。

3 讨论

α-地中海贫血HbH病在中国南方,尤其是广西地区有较高的基因型频率[4-6],HbH病可分缺失型分非缺失型。非缺失型HbH病的α-地贫基因点突变多发生在功能较强的α2珠蛋白基因,α珠蛋白链的合成减少更显著,导致比缺失型HbH病更严重的临床表现和血液学改变[3]。基于表型与基因型相结合的地贫基因诊断原

图1 血红蛋白组份高效液相色谱分析图

Fig.1: HPLC analysis of the hemoglobin components in the proband and his family members. *A*: Father of the proband (I_1); *B*: Mother (I_2); *C*: Brother (II_1); *D*: Sister (II_2); *E*: The proband (II_3); *F*: Pedigree analysis.

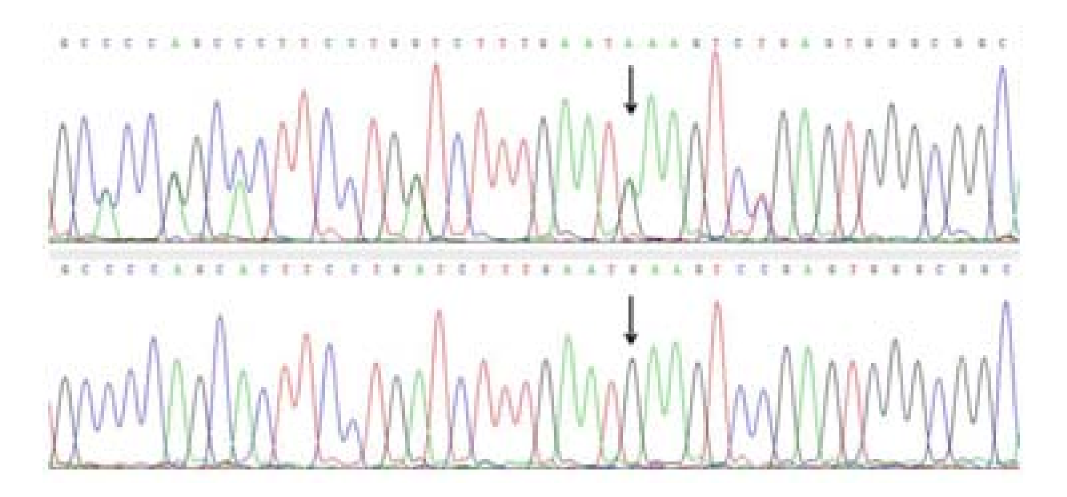


图2 先证者及其父亲DNA测序结果图

Fig.2 DNA sequencing for the proband and his father. The arrows indicate the position of $\alpha^{*92A>G}\alpha$ mutation. Upper: DNA sequencing result of th proband's father showing a heterozygous A/G mutation; Lower: DNA sequencing result of the proband showing a homozygous A/G combined with a $--^{SEA}$ mutation.

则[3]，该家系中先证者血常规检测结果显示有明显MCV和MCH降低及中度贫血，血红蛋白组份分析检测检出HbH且HbA2降低，为典型α-地贫HbH病表型特征，但常规地贫基因检测为SEA缺失杂合（--^{SEA}/αα）的标准型α-地贫基因型，其基因型与表型明显不相符，提示很可能存在未检出的少见或罕见α-地贫基因突变；家系成员中先证者哥哥（Ⅱ$_1$）和姐姐（Ⅱ$_2$）亦是如此（表1）。经进一步α珠蛋白基因测序分析，这些家系成员均检出α-地贫基因α$^{*92A>G}$突变，确认先证者及先证者姐姐的基因型为--^{SEA}/α$^{*92A>G}$α（非缺失型HbH病），先证者哥哥基因型为-α$^{3.7}$/α$^{*92A>G}$α（标准型α-地贫）、父亲基因型为αα/α$^{*92A>G}$α（静止型α-地贫），此基因型结果与表型相符；也确认此为父源突变基因而遗传至姐弟三人，符合孟德尔遗传规律。表1的数据也显示，先证者母亲（Ⅰ$_2$）为缺失型HbH病（基因型--^{SEA}/-α$^{3.7}$），其贫血程度等症状比非缺失型HbH病的儿子（Ⅱ$_3$）和女儿（Ⅱ$_2$）较轻。

目前临床上的地贫基因检测，主要是采用商品化试剂盒检测本地区常见地贫基因类型，罕见或未知突变类型不在检测范围而易于造成漏检，因此地贫基因诊断是基于表型与基因型相结合的诊断原则，当受检者血液学表型与常规检测的地贫基因型不符时，可能存在罕见或未知突变，须进一步进行检测分析预以确认，本研究的结果也证实了这种地贫基因诊断原则的重要性与实用性。

本家系中罕见α-地中海贫血基因*92A>G，为α2珠蛋白基因3'UTR的Poly A区域92A>G突变（AATAAA>AATGAA），最早报道发现于土耳其南部[7]，此突变位点携带者具有MCV和MCH降低的小细胞低色素表型，纯合个体呈现HbH病表型特征[8]。本家系为此突变位点于中国人群中的属于首次报道，家系成员生活在中国南方边境地区，可能与地中海贫血突变类型的地域性分布有一定联系。

本研究确定了中国人群中的罕见α-地贫基因α$^{*92A>G}$突变；也提供了携带此突变的静止型α-地贫，以及复合此突变的非缺失型HbH病的基本表型特征；丰富了中国人群α-地中海贫血基因突变谱，有助于指导此病的人群分子筛查、临床基因诊断、产前基因诊断和遗传咨询。

参考文献：

[1] Rund D. Thalassemia 2016: modern medicine battles an ancient disease[J]. Am J Hematol, 2016, 91(1): 15-21.
[2] Xiong F, Sun M, Zhang X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China[J]. Clin Genet, 2010, 78(2): 139-48.
[3] 徐湘民, 张新华, 陈荔丽. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 2011: 20.
[4] 申芫子, 潘干华, 黄勇, 等. 广东南海地区血红蛋白H病的分子流行病学调查[J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22(1): 19-20.
[5] Chen YG, Lin TY, Chen HJ, et al. Thalassemia and risk of dementia: a nationwide population-based retrospective cohort study[J]. Eur J Intern Med, 2015, 26(7): 554-9.
[6] Tang W, Zhang C, Lu F, et al. Spectrum of α-thalassemia and β-thalassemia mutations in the Guilin Region of southern China[J]. Clin Biochem, 2015, 48(16/17): 1068-72.
[7] Yüregir GT, Aksoy K, Cürük MA, et al. Hb H disease in a Turkish family resulting from the interaction of a deletional alpha-thalassaemia-1 and a newly discovered poly A mutation[J]. Br J Haematol, 1992, 80(4): 527-32.
[8] Fei YJ, Oner R, Bözkurt G, et al. Hb H disease caused by a homozygosity for the AATAAA-->AATAAG mutation in the polyadenylation site of the alpha 2-globin gene: hematological observations[J]. Acta Haematol, 1992, 88(2/3): 82-5.

（编辑：吴锦雅）